

19.11.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 4 年    6 月 1 5 日  
Date of Application:

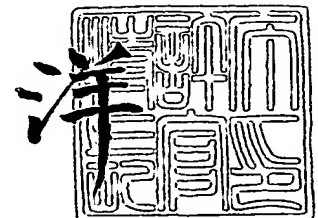
出 願 番 号            特 願 2 0 0 4 - 1 7 6 6 2 3  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 4 - 1 7 6 6 2 3 ]

出      願      人            三 菱 瓦 斯 化 学 株 式 有 限 公 司  
Applicant(s):

2 0 0 5 年    1 月    7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号    出証特 2 0 0 4 - 3 1 2 0 4 4 8

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P2004-131  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12P 41/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 新潟県新潟市太夫浜字新割 1 8 2 番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所内  
    【氏名】 杉田 将紀  
【発明者】  
    【住所又は居所】 新潟県新潟市太夫浜字新割 1 8 2 番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所内  
    【氏名】 長谷見 隆司  
【発明者】  
    【住所又は居所】 新潟県新潟市太夫浜字新割 1 8 2 番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所内  
    【氏名】 田中 昭宣  
【発明者】  
    【住所又は居所】 新潟県新潟市太夫浜字新割 1 8 2 番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所内  
    【氏名】 樋口 靖  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000004466  
    【氏名又は名称】 三菱瓦斯化学株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100117891  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 永井 隆  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 025737  
    【納付金額】 16,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0102335

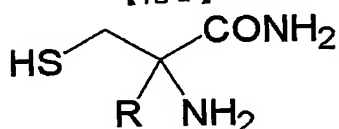
## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

一般式 (1) で示される 2-アルキルシステインアミドに、2-アルキル-L-システインアミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する活性を有する微生物の菌体又は菌体処理物を作用させて、生成物である一般式 (2) で示される 2-アルキル-L-システインと未反応の一般式 (3) で示される 2-アルキル-D-システインアミドとの混合物となし、これら化合物を一般式 (4) で示されるアルデヒド又はケトン、或いは一般式 (5) で示されるアセタール（ケタール）と反応させて、それぞれ一般式 (6) で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸及び一般式 (7) で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸アミドの混合物に誘導し、この混合物から一般式 (6) で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸を分離した後、開環、加水分解して一般式 (2) で示される光学活性 2-アルキル-L-システインとなし、これをエステル化することにより一般式 (8) で示される光学活性 2-アルキル-L-システインエステルを取得することを特徴とする、2-アルキルシステインアミドから光学活性 2-アルキル-L-システインエステルを製造する方法

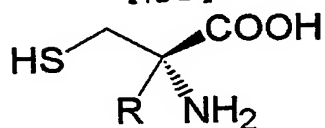
。

【化 1】



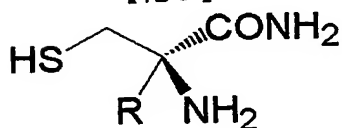
(1)

【化 2】



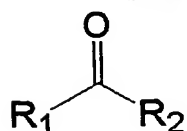
(2)

【化 3】



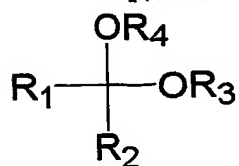
(3)

【化 4】

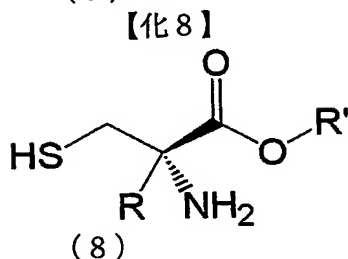
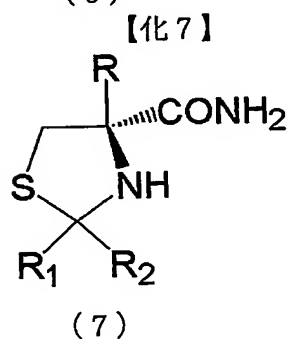
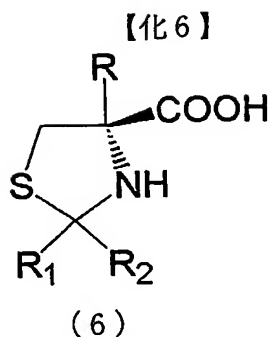


(4)

【化 5】



(5)



(但し、一般式(1)、(2)、(3)、(6)、(7)、(8)中のR及びR'は炭素数1～4の低級アルキル基を示し、一般式(4)、(5)、(6)、(7)中のR<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は各々独立した水素又は炭素数1～4の低級アルキル基、或いは両者が互いに結合した員数5～8の脂環構造を示す。但し、R<sub>1</sub>とR<sub>2</sub>の両者が同時に水素の場合を除く。)

【請求項2】

Rがメチル基である、請求項1記載の2-アルキルシステインアミドから光学活性2-アルキル-L-システインエステルを製造する方法。

【請求項3】

R、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>が何れもメチル基である、請求項1記載の2-アルキルシステインアミドから光学活性2-アルキル-L-システインエステルを製造する方法。

【請求項4】

R、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>が何れもメチル基であり、R'がメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、イソブチル基である、請求項1記載の2-アルキルシステインアミドから光学活性2-アルキル-L-システインエステルを製造する方法。

【書類名】明細書

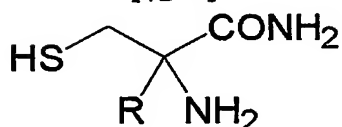
【発明の名称】光学活性 2-アルキル-L-システインエステルの製造方法

【技術分野】

【0001】

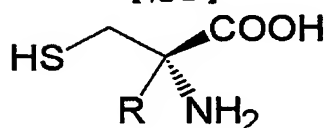
本発明は、一般式(8)で示される光学活性 2-アルキル-L-システインエステルの製造方法に関する。詳しくは、一般式(1)で示される DL 体の混合物である 2-アルキルシステインアミドに、2-アルキル-L-システインアミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する活性を有する微生物の菌体又は菌体処理物を作用させて、一般式(2)で示される 2-アルキル-L-システインを生成せしめ、生成した 2-アルキル-L-システインと一般式(3)で示される未反応の 2-アルキル-D-システインアミドの混合物を一般式(4)で示されるアルデヒド又はケトン、或いは一般式(5)で示されるアセタール(ケタール)と反応させて、それぞれ一般式(6)で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸及び一般式(7)で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸アミドに誘導し、それらの混合物から一般式(6)で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸を分取した後、開環、加水分解して一般式(2)で示される 2-アルキル-L-システインとなし、これをエステル化することにより一般式(8)で示される光学活性 2-アルキル-L-システインエステルを取得することを特徴とする、2-アルキルシステインアミドから光学活性 2-アルキル-L-システインエステルを製造する方法に関する。光学活性 2-アルキル-L-システインエステルは、各種工業薬品、農薬、及び医薬品の製造中間体として重要な物質である。

【化1】



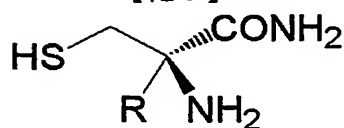
(1)

【化2】



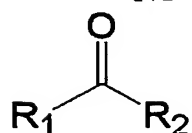
(2)

【化3】



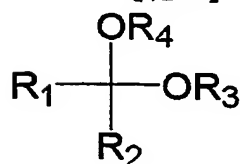
(3)

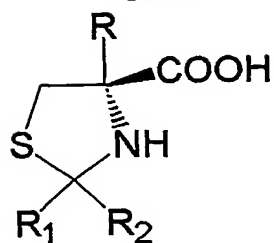
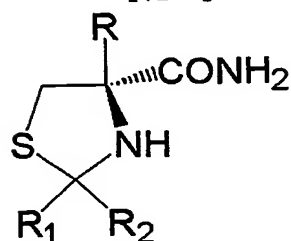
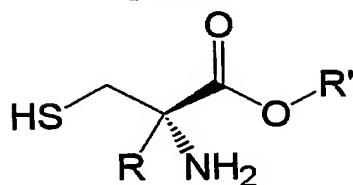
【化4】



(4)

【化5】



(5)  
【化6】(6)  
【化7】(7)  
【化8】

(8)

(但し、一般式 (1)、(2)、(3)、(6)、(7)、(8) 中の R 及び R' は炭素数 1～4 の低級アルキル基を示し、一般式 (4)、(5)、(6)、(7) 中の R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> は各々独立した水素又は炭素数 1～4 の低級アルキル基、或いは両者が互いに結合した員数 5～8 の脂環構造を示す。但し、R<sub>1</sub> と R<sub>2</sub> の両者が同時に水素の場合を除く。)

【背景技術】

【0002】

光学活性 2-アルキル-L-システインエステルの製造方法として、光学活性な原料である L-システインメチルエステルから合成する方法が知られている（例えば、特許文献 1、非特許文献 1 参照）。この方法は、光学活性な L-システインメチルエステルをピバアルデヒドで環化、ホルムアルデヒドで保護し、リチウム試薬とヨウ化メチルでメチル化した後、塩酸で開環、脱保護して 2-メチル-L-システインを塩酸塩として取得し、アルコール中にてアセチルクロライドを添加し光学活性 2-アルキル-L-システインエステルを得る手法である。しかし、出発原料が光学活性体であるなど高価な原料及び試薬を用いており、しかも工程数が多く煩雑であるため、工業的に優れた方法とは言いがたい。一方、一般式 (1) で示される 2-アルキルシステインアミドのアミド結合を微生物が有する酵素を利用して不斉加水分解し、DL 混合物である 2-アルキルシステインアミドから、光学活性 2-アルキル-L-システインエステルを製造する方法は報告されていない。

【0003】

【特許文献 1】 米国特許第 6, 403, 830 号明細書

【非特許文献 1】 Gerald Pattenden, Stephen M. Thomas and Martin F. Jones, Tetrahedron, Vol 149, No. 10, pp 2131-2138, 1933

【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、従来技術における上記のような問題を解決し、各種工業薬品、農薬、及び医薬品の製造中間体として重要な光学活性 2-アルキル-L-システインエステルを製造するための、経済性に優れ工業的に実施可能な方法を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

【0005】

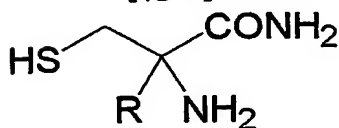
本発明者らは、原料的に手当し易い DL 混合物の 2-アルキルシステインアミドから、高品質な光学活性 2-アルキル-L-システインエステルを効率良く製造する方法に関して鋭意検討を行った。その結果、一般式 (1) で示される 2-アルキルシステインアミドを生化学的に不斉加水分解することによって、一般式 (2) で示される 2-アルキル-L-システインと未反応の一般式 (3) で示される 2-アルキル-D-システインアミドの混合物となすことはできるが、両者の、水及び各種有機溶媒に対する溶解度や分配係数等の物理化学的性状に大きな差がないため効率的な分離を行うためには更なる改良を要することを知った。そこで検討を加え、前記混合物を一般式 (4) で示されるアルデヒド又はケトン、或いは一般式 (5) で示されるアセタール (ケタール) と反応させて、それぞれ一般式 (6) で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸及び一般式 (7) で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸アミドに誘導した後、それらの混合物から一般式 (6) で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸を分取し、開環、加水分解して一般式 (2) で示される 2-アルキル-L-システインとなすことにより、未反応の 2-アルキル-D-システインアミド含量が著しく少ない、非常に高品質な 2-アルキル-L-システインが得られ、さらに、これをエステル化することによって一般式 (8) で示される光学活性 2-アルキル-L-システインエステルを効率良く製造できる本発明を完成するに至った。

【0006】

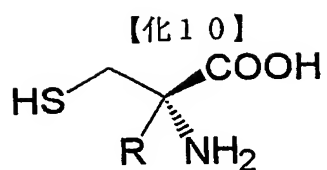
すなわち、本発明は、2-アルキルシステインアミドから、効率良く高品質な光学活性 2-アルキル-L-システインエステルを得るための、1) ~ 4) に示す製造方法に関する。

1) 一般式 (1) で示される 2-アルキルシステインアミドに、2-アルキル-L-システインアミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する活性を有する微生物の菌体又は菌体処理物を作用させて、生成物である一般式 (2) で示される 2-アルキル-L-システインと未反応の一般式 (3) で示される 2-アルキル-D-システインアミドとの混合物となし、これら化合物を一般式 (4) で示されるアルデヒド又はケトン、或いは一般式 (5) で示されるアセタール (ケタール) と反応させて、それぞれ一般式 (6) で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸及び一般式 (7) で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸アミドの混合物に誘導し、この混合物から一般式 (6) で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸を分離した後、開環、加水分解して一般式 (2) で示される光学活性 2-アルキル-L-システインとなし、これをエステル化することにより一般式 (8) で示される光学活性 2-アルキル-L-システインエステルを取得することを特徴とする、2-アルキルシステインアミドから光学活性 2-アルキル-L-システインエステルを製造する方法。

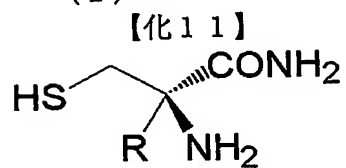
【化 9】



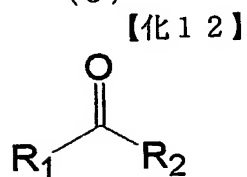
(1)



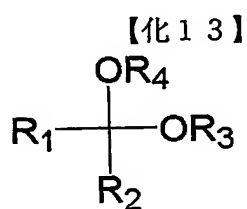
(2)



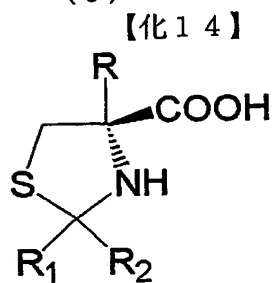
(3)



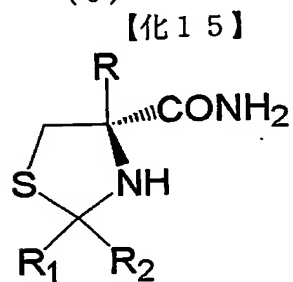
(4)



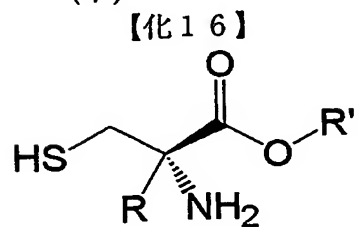
(5)



(6)



(7)





(8)

(但し、一般式(1)、(2)、(3)、(6)、(7)、(8)中のR及びR'は炭素数1~4の低級アルキル基を示し、一般式(4)、(5)、(6)、(7)中のR<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は各々独立した水素又は炭素数1~4の低級アルキル基、或いは両者が互いに結合した員数5~8の脂環構造を示す。但し、R<sub>1</sub>とR<sub>2</sub>の両者が同時に水素の場合を除く。)

2) Rがメチル基である、1)記載の2-アルキルシステインアミドから光学活性2-アルキル-L-システインエステルを製造する方法。

3) R、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>が何れもメチル基である、1)の2-アルキルシステインアミドから光学活性2-アルキル-L-システインエステルを製造する方法。

4) R、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>が何れもメチル基であり、R'がメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、イソブチル基である、1)記載の2-アルキルシステインアミドから光学活性2-アルキル-L-システインエステルを製造する方法。

#### 【発明の効果】

##### 【0007】

本発明の方法によれば、各種工業薬品、農薬、及び医薬品の製造中間体として重要な光学活性2-アルキル-L-システインエステルを高品質かつ安価に製造することが可能となる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0008】

以下に本発明の詳細について説明する。本発明の原料となる2-アルキルシステインアミドを示す一般式(1)におけるRは、炭素数1~4の低級アルキル基であればよく、特に制限はないが、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、secブチル及びtブチルなどの直鎖又は分枝した低級アルキル基が好適であり、メチル基が特に好適である。

##### 【0009】

本発明で使用する一般式(1)で示される2-アルキルシステインアミドは、その製法等に特に制限はなく、例えば該当する4-アルキルチアゾリジン-4-カルボン酸アミド誘導体を加水分解する方法などによって得ることができる。また用いる2-アルキルシステインアミドは、遊離物の他、塩酸塩、硫酸塩、酢酸塩等の塩として用いることも可能である。

##### 【0010】

本発明の一般式(1)で示される2-アルキルシステインアミドの生化学的不斉加水分解に使用される微生物は、2-アルキル-L-システインに対応する2-アルキル-L-システインアミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する活性を有する微生物であればよく、このような微生物として例えば、キサントバクター属、プロタミノバクター属及びミコプラナ属等に属する微生物、具体的にはキサントバクター フラバス (*Xanthobacter flavus*) NCIB10071、プロタミノバクター アルボフラバス (*Protaminobacter alboflavus*) ATCC8458、ミコプラナ ラモサ (*Mycoplasma ramosae*) NCIB9440、ミコプラナ ディモルファ (*Mycoplasma dimorpha*) ATCC4279が挙げられるがこれらに限定されるものではない。また、これら微生物から人工的変異手段によって誘導される変異株、或いは細胞融合や遺伝子組換え法等の遺伝学的手法により誘導される組換え株等の何れの株であっても上記能力を有するものであれば、本発明に使用できる。

##### 【0011】

これらの微生物の培養は、通常資化し得る炭素源、窒素源、各微生物に必須の無機塩、栄養等を含有させた培地を用いて行われる。培養時のpHは、4~10の範囲であり、温度は20~50℃である。培養は1日~1週間程度好氣的に行われる。このようにして培養した微生物は、生菌体又は該生菌体処理物、例えば培養液、分離菌体、菌体破砕物、さらには精製した酵素として反応に使用される。また、常法に従って菌体又は酵素を固定化して使用することもできる。

## 【0012】

2-アルキルシステインアミドの生化学的不斉加水分解反応の条件は、2-アルキルシステインアミドの濃度が0.1~40wt%、2-アルキルシステインアミドに対する微生物の使用量が乾燥菌体として重量比0.0001~3、反応温度が10~70℃、pHが4~13の範囲である。なお、2-アルキルシステインアミドの濃度が高い場合には、前記微生物の使用量が、好ましい範囲の上限である3以下であって、反応が好適に実施できる比率を適宜選択すればよい。また、得られる2-アルキルシステインは酸化を受けやすく、酸素存在下で放置すると2量化したジスルフィド(2, 2'-ジアルキルシスチン)となる。これを防止するため、生化学的不斉加水分解反応は窒素等の不活性ガス雰囲気で行なうのが好ましいが、系内に2-メルカプトエタノール等の還元性物質を共存させる方法も可能である。また、反応に用いる全ての溶媒を反応実施前に脱気すると、副生成物を生成せず好適に反応が進行する。さらに、Fe、Mn、Zn、Ni、Coなどの各種金属イオンを反応溶液中に1~50ppm添加することにより、不斉加水分解速度を向上させることができる。好ましくは、2価のMnを5~20ppm加えることにより、反応速度は、金属イオンを添加しない場合に比べて2~5倍ほど向上する。生化学的不斉加水分解反応に使用した菌体又は酵素は、酵素反応に使用した後も、遠心分離若しくは濾過操作などにより回収し、生化学的不斉加水分解反応の容器に戻すことにより再利用することができる。

## 【0013】

2-アルキルシステインアミドの生化学的不斉加水分解反応で生成した光学活性2-アルキル-L-システインと未反応の2-アルキル-D-システインアミドは、一般式(4)で示されるアルデヒド又はケトン、或いは一般式(5)で示されるそれらのアセタール(ケタール)と反応させて、それぞれ一般式(6)で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸及び一般式(7)で示されるチアゾリジン-4-カルボン酸アミドに誘導される。ここで使用するアルデヒド又はケトンを表す一般式(4)のR<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は、各々独立した水素又は炭素数1~4の低級アルキル基(但し、両者が同時に水素の場合を除く)、或いはR<sub>1</sub>とR<sub>2</sub>が一つの環を形成する員数5~8の脂環構造であればよく、特に制限はないが、アルキル基としては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、secブチル及びtブチルなどの直鎖又は分枝した低級アルキル基が好適であり、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>の両者がともメチル基である場合が特に好適である。このような化合物として、具体的にはアセトン、メチルエチルケトン、シクロヘキサノン等が挙げられ、特にアセトンが好適に使用される。

## 【0014】

反応終了液から、例えば遠心分離或いは濾過膜などの通常の固液分離手段により微生物菌体を除く。さらに限外濾過又は活性炭等の吸着剤を用いて微生物由来の有機物の大部分を除去するとより好適である。この反応液を濃縮して水を留去し、濃縮物を有機溶媒に溶解させる。用いる有機溶媒は、一般式(4)で示されるアルデヒド又はケトン、或いは一般式(5)で示されるそれらのアセタール(ケタール)が液体であり、かつ生化学的不斉加水分解反応液濃縮物を溶解させ得る場合、それ自体を溶媒として用いることが好ましい。一方、溶解し得なかった場合には、有機溶媒として、反応液濃縮物を溶解させ、かつ、一般式(4)で示されるアルデヒド又はケトン、或いは一般式(5)で示されるそれらのアセタール(ケタール)を溶解させるものを用いればよい。有機溶媒の種類は特に限定されないが、各々の溶解度の点でメタノール、エタノール等のアルコール類が好適に用いられる。この生化学的不斉加水分解反応物溶液に一般式(4)で示されるアルデヒド又はケトン、或いは一般式(5)で示されるそのアセタール(ケタール)を混合する。用いるアルデヒド又はケトン、或いはそのアセタール(ケタール)の量は、生化学的不斉加水分解反応に供したアルキルシステインアミドの同等モル以上であれば、特に限定はされない。多量なほど反応は速やかに進むので、均一溶液となる経済的な濃度を適宜選択して行うことが好ましい。また、反応の進行に伴い反応生成水が生じるので、これを除去しながら反応を行なうとより好適である。また反応温度は特に限定されないが、より高温であった方が

反応の進行が速いことから、還流条件で行なうのが实际的で好ましい。また、この環化反応は無触媒でも進行するが、少量の塩基を添加したほうが速やかに進行するので好ましい。用いる塩基としては特に限定はされないが、水酸化ナトリウム、テトラメチルアンモニウムヒドロキシド、アンモニア、トリメチルアミン等の塩基性物質の他、炭酸ナトリウム等の塩基性を示す塩類が使用可能である。その量が過剰であった場合、後処理の中和に必要な酸の量が増えるため好ましくなく、適当な量は生化学的不斉加水分解反応に用いたアルキルシステインアミドの5倍当量以下、好ましくは1~3倍当量である。

#### 【0015】

反応終了後の反応液から溶媒と揮発分を除去した後、この濃縮物を水に溶かすと、一般式(7)で示される、チアゾリジンカルボン酸アミドが不溶分として析出するので、これを濾別する。この濾液を塩酸、硫酸等の無機酸でpH4~6.5とした後、再度濃縮乾固した後、適当な有機溶媒を用いることにより一般式(6)で示されるチアゾリジンカルボン酸の結晶を得ることができる。この際に用いられる有機溶媒としては特に限定はされないが、結晶純度の低下要因となる無機塩類や生化学的不斉分解の際に使用した生体物質由来の不純物に対する溶解度が高く、且つ目的とするチアゾリジンカルボン酸の溶解力の低い溶媒が適宜選択されれば良く、そういった意味でエタノールやブタノール等のアルコール類、テトラヒドロフランやジオキサン等のエーテル類が好適に用いられる。

#### 【0016】

次いで、濾取した一般式(6)で示されるチアゾリジンカルボン酸の結晶を水溶液となし加熱還流すると、チアゾリジン環の加水分解的開環反応が進行する。この際、生成するアルデヒド又はケトン(4)を系外に除去しながら行くと反応がより速やかに進行する。また、触媒として塩酸や硫酸等の酸を用いることによっても反応がより速やかに進行するが、この場合にはアミノ酸の酸塩が得られることになる。反応後の反応液は、エーテルや塩化メチレン等の非極性有機溶媒を加えて、分液、洗浄して、残留するアルデヒド又はケトンを除去する。この水層を濃縮すると一般式(2)で示される光学活性アルキル-L-システイン又はその塩が得られる。

#### 【0017】

この一般式(2)で示される光学活性アルキル-L-システイン又はその塩を、あらかじめ塩化水素ガスを吹き込んだエステル化の目的試薬とするアルコール溶液に溶解させ、還流することによりエステル化することができる。このとき、アルコール中に含まれる塩化水素の量が光学活性アルキル-L-システインに対して1.1~4倍当量存在するように塩化水素ガスを吹き込んで使用すると収率及び純度の面で良好にエステル化反応を行うことができるので好ましい。一方、酸塩である光学活性アルキル-L-システインの塩をエステル化する場合には、塩化水素の量がその塩に対して0.1~3倍当量存在するように減じて反応させることが好ましい。エステル化の目的試薬となるアルコールは、光学活性アルキル-L-システイン又はその塩に対して同等モル以上存在すればよいが、多いほど反応は早く進行するので、原料である光学活性アルキル-L-システイン又はその塩が均一に溶解し、経済的にも許容できる範囲の量のアルコールを使用するのが望ましい。また、塩化水素ガスを吹き込む代わりにアルコールに塩化アセチルを添加することにより、還流条件で塩化水素を反応溶液内に発生させて、エステル化を進行させることもできる。エステル化の進行とともに水が生成するが、生成する水を除去しながら反応を行うとより速やかに反応が進行する。反応終了後、反応液を濃縮することによりアルコールと塩化水素ガス等を除去すると一般式(8)で示される光学活性アルキル-L-システインエステルの塩酸塩が得られる。光学活性アルキル-L-システインエステルの塩酸塩と同当量の塩基を添加することにより遊離した光学活性アルキル-L-システインエステルを得ることができる。光学活性アルキル-L-システインエステルの塩酸塩を遊離化する際に用いる塩基は、特に限定はされないが、水酸化ナトリウム、水酸化ナトリウム、アンモニア等の塩基性物質の他、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の塩基性を示す塩類が使用可能である。光学活性アルキル-L-システインエステルは適当な有機溶媒で抽出することが可能であり、無機塩が溶解せず、目的とする光学活性アルキル-L-システインエステルの溶解度

が高い溶媒が適宜選択されれば良く、そういった意味で塩化メチレンやヘキサン、ジエチルエーテル等の非水溶性有機溶媒が好適に用いられる。抽出に用いた有機溶媒を留去した後、濃縮物を蒸留等によって精製することにより光学活性アルキル-L-システインエステルが得られる。

#### 【0018】

本発明の方法によって、具体的には、例えば2-メチル-L-システインイソブチルエステル、2-エチル-L-システインメチルエステル等の光学活性2-アルキル-L-システインエステルを製造することができる。

#### 【実施例】

#### 【0019】

本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれによって限定されるものではない。

#### 実施例1

#### 【0020】

以下の組成を有する培地を調製し、この培地200mLを1Lの三角フラスコに入れ、滅菌後、キサントバクターフラバス (*Xanthobacter flavus*) NCIB10071を接種し、30℃で48時間振とう培養を行った。次いで培養液から、遠心分離により、乾燥菌体1.0gに相当する生菌体を得た。

#### 培地組成 (pH7.0)

グルコース	10 g
ポリペプトン	5 g
酵母エキス	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.4 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.01 g
水	1 L

#### 【0021】

2-メチルシステインアミド塩酸塩10.0g (0.059mol) を水300mLに溶かした後、500mLのフラスコに入れ、乾燥菌体1.0gに相当する生菌体を加えて、窒素気流下、40℃で24時間攪拌して加水分解反応を行った。反応後、反応液から遠心分離によって菌体を除去して上清を得た。この上清をロータリーエバポレーターで濃縮した後、メタノール150mLに溶解させた。続いてアセトン200mL、炭酸ナトリウム3.6g (0.034mol) を加えて16時間、室温で攪拌した。反応液を濃縮後、50mLの純水を加えて析出した結晶を濾別した。濾液に濃塩酸(36%) 6.9gを加えpHを6とした後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。エタノールを用いてこの濃縮物の再結晶を行い、無色透明な2, 2, 4-トリメチルチアゾリジン-4-カルボン酸5.0g (0.029mol) の結晶を得た。得られた2, 2, 4-トリメチルチアゾリジン-4-カルボン酸を100mLの純水に溶解させ、窒素気流下にて3時間還流を行った。反応液をロータリーエバポレーターで濃縮した後、減圧乾燥し、3.8g (0.028mol) の2-メチル-L-システインを得た。この3.8g (0.028mol) の2-メチル-L-システインを、400mLの3%の塩化水素を含むイソブタノールに溶解させ、窒素気流下にて還流を9時間行った。反応液をロータリーエバポレーターで濃縮した後、300mLのヘキサンに分散させた。ヘキサンの分散液に炭酸ナトリウム1.5g (0.014mol) を添加して、分液抽出を行い、ヘキサン層を回収した。回収したヘキサン層を200mLの水で洗浄した後、硫酸マグネシウムでヘキサン層を乾燥させ、ロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮物を減圧蒸留することにより無色透明の液体の2-メチル-L-システインイソブチルエステルを4.6g (0.024mol) 得た。反応に仕込んだラセミ混合物中の2-メチル-L-システインアミドからの単離収率は82mol%、2-メチルシステインアミドのラセミ混合物からの単離収率は41mol%

であった。また、この液体を、光学異性体分離カラムを用いた液体クロマトグラフィーによって分析した結果、光学純度は98% e. e. 以上であった。

2-メチル-L-システインイソブチルエステル；無色透明液体（沸点113℃/1.4 kPa）

$[\alpha]_D -13.1$  deg in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  c 1.75%

質量スペクトル (EI法)  $m/z = 192$  (M+H)

$^1\text{H-NMR}$  (90MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm] 3.93 (2H, d,  $J=6.6$  Hz), 3.00 (1H, d,  $J=13.6$  Hz), 2.58 (1H, d,  $J=13.6$  Hz), 1.67-2.05 (1H, m), 1.76 (3H, s, br), 1.38 (3H, s), 0.96 (6H, d,  $J=6.6$  Hz)

IR [cm $^{-1}$ ] (KBr) N-H 3377, 3309, 1599 C-H 2964, 2875 C=O 1732

元素分析 (測定値) C; 50.54, H; 8.92, N; 7.33, (計算値) C; 50.23, H; 8.96, N; 7.32

## 【書類名】要約書

## 【要約】

## 【課題】

各種工業薬品、農薬及び医薬品の製造中間体として重要な光学活性 2-アルキル-L-システインエステルの経済的で工業的に実施可能な製造方法を提供する。

## 【解決手段】

2-アルキルシステインアミドに、2-アルキル-L-システインアミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する活性を有する微生物の菌体又は菌体処理物を作用させて、生成物である 2-アルキル-L-システインと未反応の 2-アルキル-D-システインアミドとの混合物となし、これをアルデヒド又はケトン、或いはアセタール（ケタール）と反応させてチアゾリジン-4-カルボン酸とチアゾリジン-4-カルボン酸アミドとなし、その混合物からチアゾリジン-4-カルボン酸を分離した後、開環、加水分解して 2-アルキル-L-システインを得、これをエステル化することによって 2-アルキル-L-システインエステルを製造する。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-176623
受付番号	50401003074
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成16年 6月17日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成16年 6月15日

特願 2 0 0 4 - 1 7 6 6 2 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 4 4 6 6 ]

1. 変更年月日

1 9 9 4 年 7 月 2 6 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都千代田区丸の内 2 丁目 5 番 2 号

氏 名

三菱瓦斯化学株式会社



# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017140

International filing date: 18 November 2004 (18.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-176623  
Filing date: 15 June 2004 (15.06.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 January 2005 (20.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**